фективностью лечения хеликобактериоза. Тест «Pyloriset Dry» можно использовать для помощи в диагностике инфицирования H. pylori как экспресс-метод. Мы считаем, что коммерческие иммунологические тест-системы «ИммуноКомб II H.pylori IgG» и «Pyloriset Dry», которые разработаны для определения антител к Helicobacter pylori у человека, можно рекомендовать для аналогичного исследования у обезьян.

SUMMARY

The study of antibodies to Helicobacter pylori in monkeys serum was carried out using two commercial kits "ImmunoComb II H.pylori IgG» and "Pyloriset Dry». High percentage of antibodies was determined, but mostly in low titers. Preference is given to "ImmunoComb II H.pylori IgG» kit, which gives qualitative and quantitative assessments of antibodies in the serum. This test allows serological monitoring of Helicobacter pylori infection and control of treatment of helicobacteriosis in animals.

Литература

1. Белая, Ю.А. Частота встречаемости специфических антигенов Helicobacter pylori при заболеваниях желудочно-кишечного тракта. / Ю.А. Белая, М.С. Вахрамеева, В.Г. Петрухин, В.М. Бондаренко, О.Ф. Белая, В.В. Евдокимов, Д.М. Курманова, Т.И. Юдина, В.Г. Нестеренко // ж/л микробиол. 2004. № 6. С. 63-69.
2. ДУДК:ин, Т.В. Методы выявления Helicobacter pylori. / Т.В. ДУДК:ин, Н.А. Соловьева, В.Г. Жуховицкий и др.// Росс.гастроэнтерол.журн. 2001. № 2. С. 77-89.
3. Калашникова, В.А. Инфицирование обезьян Helicobacter pylori. / В.А. Калашникова // Ветеринария. 2006. № 7. С. 23-25.
4. Калашникова, В.А. ПЦР-диагностика Helicobacter pylori у обезьян. В.А. Калашникова // Ветеринарная патология. 2006. № 3 (18).С. 57-60.
5. Махова, М.А. Молекулярно-биологические методы в диагностике хеликобактеной инфекции: Автореф. дисс…к.б.н. / М.А. Махова, Москва, 2003. 24 с.
6. Чайка, Н.А. Кампилобактериоз. / Н.А. Чайка, Л.Б. Хазенсон, Ж.П. Бутцлер // М.: «Мед-на», 1988. С. 115-133.
7. Une, J. Helicobacter Species and Helicobacter Infection in Animals. / J. Une // Materials of 28th World Congress of the World Small Animal Veterinary Association, 24-27 okt. 2003, Thailand.

УДК: 579.252.55:615.332:579.25:577.212.3

В.И. Семенихин, А.С. Донченко, С.А. Юрик

(Институт экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока, п. Краснообск, Новосибирская область)

ВЫЯВЛЕНИЕ ВОЗБУДИТЕЛЯ НЕКРОБАКТЕРИОЗА СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ С ПОМОЩЬЮ ГНЕЗДОВОЙ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ

Некробактериоз – широко распространенное инфекционное заболевание, которым болеют все виды животных и птиц, а также и человек. Первичным агентом в возникновении данного заболевания является *Fusobacterium necrophorum* – грамотрицательная, полиморфная, неподвижная палочка, растущая в строго анаэробных условиях, не образующая спор и капсул. Болезнь причиняет экономический ущерб из–за снижения многих показателей, в том числе молочной продуктивности на 5–25%, интенсивности роста на 15–25% [1–3].

Основным способом лабораторной диагностики некробактериоза крупного и мелкого рогатого скота в настоящее время является бактериологическое исследование: микроскопия мазка, посев на питательные среды, биопроба на лабораторных животных. Эти методы диагностики имеют свои минусы. Так, из очагов поражения наряду с *Fusobacterium necrophorum*, обладающей вирулентностью, выделяют и невирулентные биотипы: *Fusobacterium pseudonecrophorum*, находящиеся в рубце, а также атипичные формы, которые никогда не вызывают заболевание, но по морфологическим признакам очень схожи с вирулентными вариантами. Одновременно в больших количествах выделяется сопутствующая микрофлора: стафилококки, стрептококки, микрококки, картофельная, кишечная палочки и другие микроорганизмы. Поэтому выделить возбудителя заболевания сложно. В целом на постановку диагноза затрачивается 12–16 суток, а в

случае значительного обсеменения биологических образцов вульгарной микрофлорой это время увеличивается на 6–10 дней.

В настоящее время наиболее чувствительными и специфичными признаны методы, основанные на выявлении фрагментов генома возбудителя в биологическом материале с помощью полимеразной цепной реакции. Этот метод позволяет обнаружить возбудителя при очень низких его концентрациях и сократить сроки диагностических исследований в 8–10 раз в сравнении с бактериологическими методами.

Материал и методы

Биологические образцы для исследований отбирали по клиническим показаниям: хромота, язвы между пальцами с серым налетом и неприятным запахом, свищи в копытном роге с гнойным истечением или без него. Выделение культур *F. necrophorum* проводили согласно «Методическим указаниям по лабораторной диагностике некробактериоза животных» [4]. Также в своей работе использовали культуры *F. necrophorum*, выделенные от животных из разных регионов Западно-Сибирского и Приволжского округов сотрудниками лабораторий по изучению некробактериоза животных ГНУ ИЭВСиДВ СО Россельхозакадемии и Всероссийского научно-исследовательского ветеринарного института (ВНИВИ, г. Казань) и переданные в лабораторию генной инженерии ИЭВСиДВ. В качестве известных использовали культуры *F. necrophorum* № 3430 и № 2, выделенных соответственно во ВГНКИ и ВИЭВ.

Для проверки специфичности полимеразной цепной реакции использовали референтные штаммы *Escherichia coli ATCC 25922, Streptococcus pyogenes (гр. A), Staphylococcus aureus ATCC 25923, Proteus vulgaris (полевой штамм), Bacillus subtilis ТНП-3, Salmonella dublin 373 315/52*, представленные сотрудниками лаборатории по изучению болезней молодняка ГНУ ИЭВСиДВ.

Выделение геномной ДНК возбудителя из биологических образцов проводили в двух вариантах: в первом – депротеинизацию суммарной ДНК проводили с помощью протеиназы К (10 мг/мл) с последующей экстракцией смесью фенол–хлороформа (1:1) и осаждением этанолом, во втором – для депротеинизации использовали 10% раствор CTAB.

В своей работе мы исходили из того, что многие факторы патогенности кодируются генами, входящими в состав мобильных генетических элементов, к которым относятся транспозоны, характерные для данных вариантов патогенных микроорганизмов. Поэтому определение последовательностей и синтеза олигонуклеотидных праймеров проводили по алгоритму выравнивания последовательностей ДНК транспозонов в программах Alignment Service V.4.0 и GENCNER [5], а для анализа праймеров по уровню свободной энергии использовали программу OLIGO 4.0. Химический синтез специфических и произвольных праймеров был осуществлен амидофосфитным методом на автоматическом синтезаторе ASM-102U (Biosset Ltd, Новосибирск) в отделе химии природных соединений ГНЦ ВБ «Вектор». Постановку полимеразной цепной реакции осуществляли на амплификаторах «Бис» М-105 (Новосибирск) или «Терцик» (Москва). О результатах судили по размеру синтезированного фрагмента к ДНК, мигрирующего в 0,8%-м геле агарозы при силе тока 35–40 мА в течение 30–40 мин. Маркером служила ДНК pUC 18, гидролизованная эндонуклеазой AluI. Документирование полученных результатов проводили с помощью цифровой фотокамеры, секвенирование ампликонов – по двум цепочкам ДНК, используя общепринятые методики Т. Маниатис, Э. Фрич, Д. Сэмбрук и Максама-Гилберта [6,7].

Результаты исследований

Нами была сконструирована тест-система по выявлению геномной ДНК вирулентных штаммов *F. necrophorum subsp. necrophorum* с помощью специфических олигонуклеотидных праймеров в гнездовой полимеразной цепной реакции. С этой целью были синтезированы две пары олигонуклеотидных праймеров, комплементарные ДНК в области, характерной для вирулентных штаммов *Fusobacterium* и отсутствующей в сопутствующей микрофлоре, такой, как стафилококки, стрептококки, микрококки, кишечная палочка. С помощью наружных праймеров № 11 и № 22 в ПЦР синтезировали больший фрагмент. Вторую пару праймеров № 011 и № 022 применяли для синтеза меньшего фрагмента, структурно входящего в больший. Анализы считали положительными, если размер первого и второго ампликонов соответствовали ожидаемым размерам соответственно 558 и 289 н.п.

Из результатов исследований, приведенных в табл. 1, следует, что положительные анализы продуктов ПЦР получали только тогда, когда в качестве мат-

Таблица 1

Результаты исследований на специфичность праймеров тест-системы

№ п/п	Наименование культуры	ПЦР с праймерами	
		наружными	внутренними
1	Staphylococcus aureus	Отрицательно	Отрицательно
2	Staphylococcus albus	Отрицательно	Отрицательно
3	Streptococcus pyogenes	Отрицательно	Отрицательно
4	Streptococcus epidermitis	Отрицательно	Отрицательно
5	Escherihia coli	Отрицательно	Отрицательно
6	Salmonella dublin	Отрицательно	Отрицательно
7	Proteus vulgaris	Отрицательно	Отрицательно
8	«Чик»» ГНУ ИЭВСиДВ	Положительно	Положительно
9	F. necrophorum, ВИЭВ-1	Отрицательно	Положительно
10	F. necrophorum, ВИЭВ-2	Отрицательно	Положительно
11	F. necrophorum, ГНУ ИЭВСиДВ	Отрицательно	Положительно
12	Дистиллированная вода	Отрицательно	Отрицательно

рицы использовали ДНК возбудителя *F. necrophorum subsp. necrophorum*. Анализы были отрицательными, когда использовали ДНК *E. coli, Streptococcus pyogenes, Staphylococcus aureus, Proteus vulgaris, B. subtilis, Salmonella dublin*.

Расчет концентрация ДНК осуществляли по Т. Маниатис, Э. Фрич, Д. Сэмбрук [6], ставя ПЦР с контрольной ДНК *F. necrophorum*. Чувствительность разработанного способа гнездовой ПЦР для диагностики некробактериоза составила 12,0 пг/мкл суммарной ДНК.

Проведенные ранее нами исследования позволили установить, что синтезируемый больший фрагмент ДНК *F. necrophorum* в 558 н.п. является транспозоном, кодирующим синтез фермента транспозазы и относится к мобильному району, содержащему факторы патогенности [8, 9]. Эксперименты с данной диагностической тест-системой для выяснения ее специфичности показали, что положительные анализы продуктов ПЦР получали только тогда, когда в качестве матрицы использовали ДНК *F.necrophorum subsp. necrophorum*. Анализы были отрицательными, когда использовали ДНК *F. pseudonecrophorum* и других бактерий.

Затем были проведены испытания данной диагностической тест-системы в сравнении с бактериологическими и биологическими методами исследования одних и тех же образцов патологического материала, отобранного от животных, подозреваемых в заболевании некробактериозом.

С этой целью поступившие для исследования пробы биоматериала делили на две части и нумеровали однозначными номерами-шифрами. Одну часть образцов исследовали в лаборатории некробактериоза животных согласно «Методическим указаниям по лабораторной диагностике некробактериоза» (Москва, ГУВ Госагропрома СССР, 01.06.1987 г.). Другую часть этих же образцов под номерами-шифрами передавали в лабораторию генной инженерии, где проводили исследования с помощью гнездовой ПЦР согласно разработанному временному наставлению с использованием в качестве контролей культур *Fusobacterium necrophorum*: ВИЭВ-1, ВИЭВ-2, ГНУ ИЭВСиДВ и дистиллированной воды. Согласно результатам комиссионного испытания, приведенным в табл. 2, представленная для апробации тест-система гнездовой ПЦР для выявления ДНК патогенных *F. necrophorum* обладает высокой специфичностью и превосходит метод бактериологического исследования по времени, затрачиваемому для выявления возбудителя заболевания в 4-10 раз.

Проводя исследования, мы обратили внимание на то, что в большинстве случаев, где были животные с хроническим инфицированием *F. necrophorum*, визуализируется только внутренний фрагмент ДНК после использования двух пар праймеров. Исключение составляли случаи острого заболевания некробактериозом (без медикаментозного вмешательства), при которых после проведения ПЦР с наружными праймерами визуализировался больший фрагмент. Однако после

Таблица 2

Результаты межлабораторных комиссионных исследований биологических образцов на некробактериоз

№ проб	Исследуемый материал	Бактериологическое и биологические исследования		ПЦР с праймерами	
		питательные среды и биопроба	получена чистая культура от мышей	наружные	внутренние
1	Фаланга 1	+	+	–	+
2	Фаланга 2	+	–	–	+
3	F. necroph. из коллекц.	+	–	–	+
4	Костн. мозг фаланги	+	+	+	+
5	Абсцесс печени 1	+	–	–	–
6	Абсцесс печени 2	+	–	–	–
7	Абсцесс печени 3	+	+	–	–
8.	F.necr. лиоф. ВИЭВ-1	+	н/и	–	+
9	F.necr. лиоф. ВИЭВ-2	+	н/и	–	+
10	Фаланга 3	+	–	–	+
11	Кровь фаланги	+	–	–	+
12	Фаланга 4	+	+	–	+
13	Фаланга 5	+	+	–	+
14	Абсцесс мышц	+	–	–	+
15	Некрот. очаг от мыши	+	–	–	+
16	F.necroph.	+	+	–	+
17	Биоматериал от мыши	+	–	+	+
18	Стенка рубца	–	–	–	–
19	Содержимое рубца	–	–	–	–
20	Фаланга 6	+	–	–	+
21	Фаланга 7	+	–	–	+
22	Фаланга 8	+	–	–	+
23	Копытцевый рог	–	–	–	–
24	Навоз	–	–	–	–
25	Фаланга 9	+	+	–	+
26	Фаланга 10	+	+	–	+

Примечание: н/и – не исследовали «+» – наличие F. necrophorum, «–» – отсутствие F. necrophorum

нескольких пассажей на печеночной среде культуры *Fusobacterium* утрачивали это качество и визуализировались только после проведения дополнительно ПЦР с внутренними праймерами. Это ориентировало на малое число копий тестируемого фрагмента в полной последовательности ДНК *Fusobacterium necrophorum subsp. necrophorum*.

По результатам испытаний были разработаны инструкция по применению тест-системы для выявления *Fusobacterium necrophorum subsp. necrophorum* методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с помощью гнездовых праймеров и технические условия. Тест-система успешно прошла государственные комиссионные испытания в 2005–2006 гг.

Заключение

В результате выполненной работы диагностическая тест-система, обладающая специфичностью и позволяющая с помощью гнездовых праймеров полимеразной цепной реакции выявлять из био-

логических образцов патогенный биотип *Fusobacterium necrophorum subsp. necrophorum*. На данную тест-систему, прошедшую государственные испытания, были получены нормативные документы: «Инструкция по применению тест-системы для выявления *Fusobacterium necrophorum subsp. necrophorum* методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с помощью гнездовых праймеров» и Технические Условия на эту тест-систему ТУ 9388-001-05095732-2006 (Россельхознадзор, регистр. № ПВР-1-2.6/01846 от 20 февраля 2007 года).

SUMMARY

The characteristic of the developed test - system for revealing Fusobacterium necrophorum subsp. necrophorum by a method plymerase chain reaction (PCR) with the help nested primers.

Литература

1. Nicholson L.A. Phylogenetic relationship of Fusobacterium necrophorum A, AB, and B biotypes based upon 16S rRNA gene sequence analysis/ L.A. Nicholson, C.J. Moppow, L.A. Corner et al.// Int. J. Svst. Bacteriol. – 1994. – Vol. 44. – № 2. – P. 315–319.
2. Самоловов А.А. Fusobacterium necrophorum: морфологические, биологические свойства, классификация/ А.А. Самоловов //Научное обеспечение ветеринарных проблем в животноводстве: Сб. науч. тр./РАСХН. Сиб. отд-ие. ИЭВСиДВ. – Новосибирск, 2000. – С. 399–406.
3. Соломаха О.И. Некоторые морфологические особенности Fusobacterium necrophorum/ О.И. Соломаха, Л.В. Кириллов, И.Б. Павлова// Аграрная Россия.– 2000. – № 3. – С.59–61.
4. Методические указания по лабораторной диагностике некробактериоза. (Утвер. ГУВ Госагропрома СССР 1 июня 1987 г.).– М. – 1987.
5. Resenchuk S.M. Alignment service: creation and processing of alignments of sequences of unlimited length/ S.M. Resenchuk , V.M. Blinov // Comput. Appl. Biosci. — 1995. — № 11. — P. 7–11.
6. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Д. // Молекулярное клонирование. — 1984. — С. 205–240.
7. Maxam F.M., Gilbert W. In: Methods in Ensymology. — 1980. — Vol. 65. — Part. I. — P. 499–550.
8. Семенихин В.И., М.А. Филипенко, Н.В.Некрасова, Е.А. Храпов, А.А. Самоловов. Генотипирование патогенного биотипа АВ Fusobacterium necrophorum necrophorum subsp. necrophorum/ В.И. Семенихин, М.А. Филипенко, Н.В.Некрасова, Е.А. Храпов, А.А. Самоловов. //Сибирский вестник сельскохозяйственной науки. – 2003, – № 1. – С.86–90.
9. Семенихин В.И. Транспозоны в передаче патогенных свойств Fusobacterium necrophorum subsp. necrophorum биотипа АВ/, А.С. Донченко, В.М. Блинов, Д.В. Сараев, А.А. Самоловов, С.В. Лопатин // Сибирский вестник сельскохозяйственной науки. – 2003. – № 4. – С. 84–87.

УДК: 619:616-091:615.9:599.32

Е.В. Семеряк, Ю.М. Гичев

(ФГУ ВПО «Омский государственный аграрный университет» факультет ветеринарной медицины)

ПАТОМОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ВНУТРЕННИХ ОРГАНОВ КРЫС ПРИ ОСТРОЙ И ХРОНИЧЕСКОЙ ИНТОКСИКАЦИИ ИВЕРТИНОМ

Введение

В практике регистрировались случаи отравления животных разных видов препаратами ивермектина, но комплексная дифференциальная диагностика затруднена, так как морфологические исследования при данном токсикозе животных не проводились. В связи с ограниченным количеством сведений о структурных изменениях внутренних органов животных при применении ивермектина, проведение патоморфологических, гистологических и морфометрических исследований на лабораторных крысах при острой и хронической интоксикации ивертином является актуальным.

Ивертин (Ivertinum) – противопаразитарный препарат, содержащий в качестве действующего вещества ивермектин. Ивермектин – первый синтезированный авермектин, который в структурном отношении представляет собой смесь 22, 23-дигидроавермектинов В1а и В1в, и обладает выраженным действием на паразитических нематод, членистоногих и их личинок.

Цель работы – выявить характер и степень выраженности морфологических изменений во внутренних органах лабораторных крыс при острой и хронической интоксикации ивертином.

Материалы и методы исследования

Патоморфологические исследования на теплокровных животных проводили на базе кафедры патологической анатомии,